

УКРАЇНА

UKRAINE



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 56975

**СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ АНАПЛАЗМОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ
ШЛЯХОМ ВИЯВЛЕННЯ АНТИГЕНУ ЗБУДНИКА В РЕАКЦІЇ
НЕПРЯМОЇ ІМУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ (РНІФ)**

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі 10.02.2011.

Голова Державного департаменту
інтелектуальної власності

A handwritten signature in black ink, appearing to read "M.V. Paladiy", is written over the printed name.

М.В. Паладій



(11) **56975**

UA

(51) МПК (2011.01)
С12N 1/20

-) Номер заявки: **u 2010 04219**
- !) Дата подання заявки: **12.04.2010**
- 4) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.02.2011**
- 46) Дата публікації відомостей про видачу патенту та номер бюлетеня: **10.02.2011, Бюл. № 3**

(72) Винахідники:
Похил Сергій Іванович, UA,
Тимченко Олена Миколаївна, UA,
Чигиринська Ніла Анатоліївна, UA,
Килипко Людмила Віталіївна, UA,
Семеренська Євгенія Іванівна, UA,
Костиря Ірина Анатоліївна, UA,
Козько Володимир Миколайович, UA,
Юрко Катерина Володимирівна, UA

(73) Власники:
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРОБІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА АМН УКРАЇНИ",
вул. Пушкінська, 14-16, м. Харків, 61057, UA,
Похил Сергій Іванович,
пр. Фрунзе, 26, кв. 99, м. Харків, 61007, UA,
Тимченко Олена Миколаївна,
вул. Героїв Праці, 47-б, кв. 245, м. Харків, 61129, UA,
Чигиринська Ніла Анатоліївна,
пров. Васнецова, 6, м. Харків, 61091, UA,
Килипко Людмила Віталіївна,
вул. Танкопія, 13/3, кв. 117, м. Харків, 61091, UA,
Семеренська Євгенія Іванівна,
вул. Акад. Павлова, 319, кв. 32, м. Харків, 61168, UA,
Костиря Ірина Анатоліївна,
пр. Леніна, 45-а, кв. 82, м. Харків, 61086, UA,
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
пр. Леніна, 4, м. Харків, 61022, UA,
Козько Володимир Миколайович,
вул. Героїв Сталінграду, 181,

(11) **56975**

кв. 25, м. Харків, 61091, UA,
Юрко Катерина
Володимирівна,
вул. Героїв Сталінграда, 181,
кв. 25, м. Харків, 61091, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ АНАПЛАЗМОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ ШЛЯХОМ ВИЯВЛЕННЯ АНТИГЕНУ ЗБУДНИКА В РЕАКЦІЇ НЕПРЯМОЇ ІМУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ (РНІФ)

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб діагностики анаплазмозної інфекції шляхом виявлення антигену збудника в реакції непрямой імунофлюоресценції (РНІФ), який відрізняється тим, що як специфічні антитіла першого порядку (Анти) при відтворенні РНІФ застосовуються поліклональні протианаплазмозні імуноглобуліни кролячі, отримані при імунізації тварин повним корпускулярним антигеном штаму *Anaplasma marginale* ВІЗВ1.

(11) 56975

Пронумеровано, прошито металевими
люверсами та скріплено печаткою
3 арк.
10.02.2011



Уповноважена особа

(підпис)



УКРАЇНА

(19) UA (11) 56975 (13) U
(51) МПК (2011.01)
C12N 1/20МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ АНАПЛАЗМОЗНОЇ ІНФЕКЦІЇ ШЛЯХОМ ВІЯВЛЕННЯ АНТИГЕНУ ЗБУДНИКА В РЕАКЦІЇ НЕПРЯМОЇ ІМУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦІЇ (РНІФ)

1

(21) u201004219
(22) 12.04.2010
(24) 10.02.2011
(46) 10.02.2011, Бюл.№ 3, 2011 р.
(72) ПОХИЛ СЕРГІЙ ІВАНОВИЧ, ТИМЧЕНКО
ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА, ЧИГИРИНСЬКА НІЛА АНА-
ТОЛІВНА, КИЛИПКО ЛЮДМИЛА ВІТАЛІВНА,
СЕМЕРЕНСЬКА ЄВГЕНІЯ ІВАНІВНА, КОСТИРЯ
ІРИНА АНАТОЛІВНА, КОЗЬКО ВОЛОДИМИР
МИКОЛАЙОВИЧ, ЮРКО КАТЕРИНА ВОЛОДИМИ-
РІВНА
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ МІКРО-
БІОЛОГІЇ ТА ІМУНОЛОГІЇ ІМ. І.І. МЕЧНИКОВА
АМН УКРАЇНИ", ПОХИЛ СЕРГІЙ ІВАНОВИЧ, ТИМ-
ЧЕНКО ОЛЕНА МИКОЛАЇВНА, ЧИГИРИНСЬКА

2

НІЛА АНАТОЛІВНА, КИЛИПКО ЛЮДМИЛА ВІТАЛІ-
ВНА, СЕМЕРЕНСЬКА ЄВГЕНІЯ ІВАНІВНА, КОС-
ТИРЯ ІРИНА АНАТОЛІВНА, ХАРКІВСЬКИЙ НА-
ЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
КОЗЬКО ВОЛОДИМИР МИКОЛАЙОВИЧ, ЮРКО
КАТЕРИНА ВОЛОДИМИРІВНА
(57) Спосіб діагностики анаплазмозної інфекції
шляхом виявлення антигену збудника в реакції
непрямої імунофлюоресценції (РНІФ), який відрі-
зняється тим, що як специфічні антитіла першого
порядку (Анти) при відтворенні РНІФ застосовують-
ся поліклональні протианаплазмозні імуноглобулі-
ни кролячі, отримані при імунізації тварин повним
корпускулярним антигеном штаму *Anaplasma*
marginale ВІЗВ1.

Корисна модель належить до медицини, а са-
ме до медичної мікробіології, зокрема до способів
лабораторної діагностики анаплазмозної інфекції
(АІ). Ця корисна модель може бути використана
для встановлення етіологічного діагнозу АІ у лю-
дей шляхом виявлення (детекції) антигену збудни-
ка (мікроколоній та клітин бактерій роду
Anaplasma) в зразках досліджуваного клінічного
матеріалу (кров, спинномозкова рідина, біоптат
кісткового мозку, печінки, селезінки, лімфовузлів).

АІ (синоніми: анаплазмоз, гранулоцитарний
анаплазмоз людини - ГАЛ) - трансмісивне інфек-
ційне захворювання людей та ссавців, що визна-
ється облігатними внутрішньоклітинними патоген-
ами - бактеріями роду *Anaplasma* і характери-
зується розвитком синдрому загальної інфекційної
інтоксикації та специфічним враженням переважно
білих клітин крові (найчастіше гранулоцитів) і зна-
чно рідше - макрофагів, еритроцитів та тромбоци-
тів [1-3].

За сучасною класифікацією бактерії роду
Anaplasma належать до типу *Proteobacteria*, класу
 α (Alpha) *Proteobacteria*, порядку *Rickettsiales*, ро-
дини *Anaplasmataceae*. Остання включає роди -
Anaplasma, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Wolbachia* [4].
Рід *Anaplasma* налічує три види: *A. marginale*, *A.*
platys та *A. phagocytophilum*. Анаплазми - грамне-
гативні, гетеротипні за формою (від кокоподібної
до еліпсоїдної), розміром 0,3-0,4 мкм в діаметрі

(клітини еліпсоїдної форми в довжину можуть до-
сягати 1,2-1,5 мкм), не здатні до рухливості, спор
не утворюють. Рівень подібності нуклеотидної по-
слідовності гену 16S рРНК між штамми різних
видів роду *Anaplasma* складає не нижче 96%.
Вміст гуаніну та цитозину в ДНК *Anaplasma* spp.
коливається в широких межах: від 43 до 56 mol %.

Anaplasma spp. є облігатними внутрішньоклі-
тинними патогенами. При розмноженні у цитопла-
зматичних вакуолях інфікованих тропних клітин,
анаплазми утворюють характерні тільця - так звані
морули, які є мікроколоніями - скупченнями корпу-
скул збудника (від 3-5 до 50-100 клітин), що за фо-
рмою нагадують ягоду тутового (шовковичного)
дерева та мають розмір 0,3-2,5 мкм. Життєвий
цикл анаплазм включає як перебування в організмі
безхребетних хазяїв (кліщів, рідше - гельмінтів),
так і в організмі хребетних тварин (переважно сса-
вців). В природних умовах навколишнього середо-
вища основним біологічним резервуаром цих мік-
роорганізмів є дикі ссавці, а вектором передачі -
заражені збудником кліщі родини іксодових (*Ixodi-
dae*), які харчуються на диких і свійських тваринах.
При укусі кліща із слиною анаплазми потрапляють
в організм ссавців (в тому числі й людини), інфіку-
ють тропні клітини периферійного кровотоку, ендो-
телію судин та органів гемопоезу (печінки, селезін-
ки, кісткового мозку, лімфовузлів) [5, 6].

(19) UA (11) 56975 (13) U

Види *A. marginale* та *A. platys* є збудниками анаплазмозу великої рогатої худоби (ВРХ) та інших жуйних тварин, вражаючи в якості основних клітин-мішеней еритроцити та моноцити, відповідно [4, 7]. До теперішнього часу роль цих двох видів анаплазм у формуванні патології людини не доведена. Навпроти, вид *A. phagocytophilum* (раніше - *Rickettsia phagocytophila*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, *Anaplasma phagocytophila*, HGE-агент) здатен визивати захворювання як тварин (ВРХ, коней, собак, котів та ін.), так і людей (гранулоцитарний анаплазмоз людини - ГАЛ) з ураженням білих клітин крові - гранулоцитів та макрофагів і неспецифічним клінічним перебігом у формі синдрому гострої інфекційної інтоксикації. Сучасні принципи і критерії діагностики ГАЛ основані на епідеміологічних, клінічних і лабораторних даних. Останнім відводиться вирішальне значення в етіологічній діагностиці ГАЛ, так як клінічний перебіг цього інфекційного захворювання, як правило, не супроводжується специфічними клінічними проявами, в першу чергу, у випадках субклінічних та клінічно слабо виражених формах анаплазмозу.

На теперішній час спорадичні і групові випадки ГАЛ зареєстровані на всіх континентах (за винятком Антарктиди) більш ніж в 50 країнах світу. В США, де налагоджена лабораторна етіологічна діагностика ГАЛ і де з 1997 року введена його обов'язкова реєстрація, рівень захворюваності на ГАЛ складає 24-58 випадків на 100 000 населення в рік. При цьому, рівень летальності при субклінічних і легких формах (на які припадає переважна більшість випадків) перебігу анаплазмозу становить 0,5-1,0%, а при середній важкості і важких формах досягає 7-10% [1-3]. Незважаючи на те, що в Європі перший випадок ГАЛ був зареєстрований у Словенії в 1995 році, достовірних статистичних даних щодо рівня захворюваності людей на анаплазмоз у країнах Європи й досі не існує. Проте, крім щорічно зростаючої кількості зареєстрованих випадків ГАЛ у Європі, про поширеність даного захворювання в цьому регіоні свідчить високий рівень (від 2,4 до 45%) інфікованості кліщів *Ixodes ricinus* анаплазмами та наявність у сироватці крові 2-30 % клінічно здорових людей підвищено титру антитіл проти збудника ГАЛ, що свідчить про ймовірність перенесеного захворювання в минулому [1, 8, 9].

Вперше етіологічну верифікацію випадків ГАЛ в Україні здійснено у 2007 році співробітниками лабораторії трансмісивних вірусних інфекцій Львівського НДІ епідеміології та гігієни МОЗ України. При цьому були використані діагностичні препарати для твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA), що містили в якості анаплазмозного антигену клітини *A. phagocytophilum*, виготовлені в National Center for Zoonotic, Vector-borne, and Enteric Disease, CDC (1600 Clifton Rd., Atlanta, GA 30333, USA). Однак, через відсутність загальнодоступних, простих у застосуванні, ефективних і недорогих діагностичних біопрепаратів і до теперішнього часу випадки ГАЛ у людей діагностуються дуже рідко, хоча на території країни існують чисельні осередки популяцій кліщів та досить часто реєструються інші трансмісивні кліщові інфек-

ційні захворювання (наприклад, кліщовий бореліоз), природні ареали циркуляції збудників яких співпадають із ареалами циркуляції анаплазм [10, 11].

Робоча група по вивченню *Rickettsia*, *Coxiella*, *Anaplasma* (*Ehrlichia*) і *Bartonella* (EVWOG) Європейського товариства з клінічної мікробіології та інфекційних хвороб рекомендувала основні (безсумнівні) та допоміжні (ймовірні) критерії для найбільш широко застосовуваних методів лабораторної діагностики ГАЛ: виявлення з допомогою світлової мікроскопії специфічних інтрацитоплазматичних мікроколоній (морул) збудника в клітинах-мішенях; виділення штамів збудника шляхом вирощування на спеціальних культурах еукаріотичних клітин; індикація специфічних фрагментів геному збудника з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР); виявлення в зразках клінічного матеріалу антигену збудника та (або) визначення рівня антитіл проти збудника в сироватці крові з допомогою імунологічних (серологічних) методів [12]. Завдяки простоті і уніфікованості технології відтворення, достатньо високого рівня специфічності, чутливості та відтворюваності результатів дослідження сьогодні найбільш часто для лабораторної діагностики анаплазмозу застосовуються імунологічні методи: імуноферментний аналіз (ІФА), твердофазний імуноферментний аналіз (ТІФА), імуноблотинг, реакція тривалого зв'язування компліменту (РТЗК), реакція імунофлюоресценції (РІФ), реакція непрямой імунофлюоресценції (РНІФ) та ін. [9, 12-15]. Використання РНІФ дозволяє діагностувати ГАЛ як на ранній стадії захворювання (шляхом виявлення в досліджуваних зразках клінічного матеріалу антигену збудника), так і в період розпалу його клінічних проявів та на стадії видужання (шляхом визначення рівня антитіл проти збудника в сироватці крові). Принцип технології виявлення в досліджуваних зразках клінічного матеріалу антигену збудника ГАЛ методом РНІФ полягає в наступному [14, 15]: препарати із нанесеними і зафіксованими зразками клінічного матеріалу оброблюють антитілами проти анаплазм (поліклональними або моноклональними імунними сироватками, чи імуноглобулінами, які є антитілами першого порядку - Ант1), що зв'язуються (адсорбуються) із антигенами (мікроколоніями і окремими клітинами) збудника ГАЛ за умови наявності останніх в досліджуваному зразку; в послідовному, адсорбовані на антигенах Ант1 виявляються шляхом додаткової обробки препаратів противидовими (відносно видової приналежності використаних Ант1) флюоресцюючими антитілами (антивидовими сироватками або імуноглобулінами, міченими флюорохромом, які є антитілами другого порядку - Ант2). Таким чином, в досліджуваних зразках клінічного матеріалу на поверхні мікроколоній (морул) і окремо розташованих клітин збудника ГАЛ утворюється двошаровий комплекс із Ант1 і Ант2, який містить флюоресцюючий барвник, що дозволяє при проведенні люмінесцентно-мікроскопічного дослідження препаратів їх виявляти (візуалізувати).

Антивидові флюоресцюючі сироватки та імуноглобуліни, які при відтворенні РНІФ виконують

функцію Ант2 є універсальними і загальнодоступними імунобіологічними препаратами завдяки налагодженому комерційному їх виробництву та широкому застосуванню в медицині, ветеринарії та біології. Навпроти, протианаплазмозні поліклональні або моноклональні сироватки чи імуноглобуліни, які при відтворенні РНІФ виконують роль Ант1, є дефіцитними і високовартісними імунобіологічними препаратами. Крім того, в розвинутих країнах світу (США, країни Європи) як експериментальні зразки таких препаратів, так і комерційні діагностичні тест-системи до складу яких вони входять (в якості окремого продукту або способу його отримання) захищені чинними документами правової охорони як об'єкти інтелектуальної власності, що робить їх недоступними для використання в Україні з метою лабораторної діагностики ГАЛ.

Відомі в теперішній час способи діагностики ГАЛ шляхом виявлення антигену збудника в РНІФ (Патент США №5955359 від 21.09.1999 р.; патент США № 6964855 від 16.10.2003 р.) полягають у застосуванні різних типів діагностичних поліклональних/моноклональних протианаплазмозних сироваток/імуноглобулінів, які отримані із використанням штамів анаплазм виду *A. phagocytophilum* шляхом імунізації лабораторних тварин (мишей, кроликів, собак та інших тварин) повними корпускулярними (поліклональними) або моноклональними (високоочищеними пептидними) антигенами (відповідно) цих мікроорганізмів, чи моноклональними антигенами, отриманими із використанням гібридомної технології. Застосування таких типів діагностичних препаратів в якості Ант1 при виявленні антигену збудника ГАЛ з допомогою РНІФ є спільними ознаками із способом, що заявляється. Відтворення РНІФ із використанням вказаних типів експериментальних діагностичних препаратів і тест-систем, до складу яких вони входять, в цілому забезпечує задовільну якість діагностики ГАЛ з рівнем чутливості досліджень не нижче 82% (при співставленні із результатами індикації збудника методом ПЛР), специфічності - 83% і відтвореності результату - 89% [3, 15, 16]. Проте, відомі способи діагностики ГАЛ шляхом виявлення антигену збудника в РНІФ мають ряд суттєвих недоліків. Основними з них, які заважають досягнути бажаного технічного результату, є наступні. Складність вирощування *A. phagocytophilum* у культурі спеціальних ліній еукаріотичних клітин (HL-60) без використання антибіотиків, що потребує освоєння високотехнологічних, дорогих методів культивування цих ліній клітин і може здійснюватись лише в спеціалізованих лабораторіях із забезпеченням належного рівня біобезпеки. Складність і висока працезатратність послідовних етапів отримання очищеного поліклонального (корпускулярного) або моноклонального (пептидного) антигену *A. phagocytophilum* як шляхом використання мікробіологічних методів, так із використанням гібридомної технології. Крім того, у відомих колекціях культур мікроорганізмів України відсутні офіційно зареєстровані (задепоновані) штами *A. phagocytophilum*.

Найближчим аналогом (прототипом) корисної моделі, що пропонується є полінуклеотид (фрагмент гену) і поліпептид головного поверхневого білку (Major Surface Protein 5 - MSP5) *A. phagocytophilum* та методи їх використання для лабораторної діагностики анаплазмозу (Патент США № 7304139 від 04.12.2007 р.). Ознаками прототипу, які збігаються із суттєвими ознаками способу що заявляється, є використання в імунологічних реакціях (ІФА, ТІФА, РІФ, РНІФ) при виявленні збудника ГАЛ у зразках біологічного матеріалу моноклональних антитіл проти MSP5 *A. phagocytophilum*. Використання препаратів таких антитіл або діагностичних тест-систем, до складу яких вони входять, забезпечує високий рівень специфічності та відтворюваності результатів досліджень, а також (за умов застосування гібридомної технології) виключає необхідність проведення технологічно складних та біологічно небезпечних етапів вирощування *A. phagocytophilum* у культурі еукаріотичних клітин і послідовної очистки живих штамів збудника з метою отримання із них антигенів для імунізації тварин. Причинами, що перешкоджають одержанню очікуваного технічного результату з допомогою прототипу є: висока вартість і технологічна складність отримання поліпептидного антигену MSP5 *A. phagocytophilum* як із допомогою гібридомної технології, так і з використанням мікробіологічних та біохімічних методів. Застосування моноклональних антитіл проти одного поліпептиду MSP5 *A. phagocytophilum* також значно звужує межі виявлення з допомогою імунологічних реакцій антигенів штамів збудника ГАЛ, які характеризуються природною широкою гетеротипністю. Крім того, в силу мозаїчного характеру інтегрованості MSP5 у зовнішній мембрані клітин *A. phagocytophilum* і обумовленого цим локального характеру зв'язування відповідних моноклональних антитіл, візуалізовані результати виявлення антигену збудника ГАЛ із допомогою РНІФ характеризуються недостатньою чіткістю важливих диференційних ознак (морфологічних особливостей мікроколоній і клітин анаплазм), що знижує ефективність даного способу діагностики анаплазмозу.

В основу корисної моделі поставлено завдання розробити ефективний спосіб лабораторної діагностики ГАЛ шляхом виявлення антигену збудника з допомогою РНІФ, при відтворенні якої б в якості Ант1 застосовувались протианаплазмозні поліклональні антитіла (проти повного корпускулярного антигену анаплазм), отримання яких було б технологічно більш простим, дешевим та біобезпечним і використання яких забезпечувало б отримання чітких диференційних ознак для оцінки результатів досліджень.

Поставлене завдання вирішувалось тим, що в способі діагностики ГАЛ шляхом виявлення антигену збудника в РНІФ у якості Ант1, згідно з корисною моделлю, використовують поліклональні протианаплазмозні імуноглобуліни кролячі (або інших видів тварин), отримані при імунізації тварин повним корпускулярним антигеном штамів виду *A. marginale*, а не штамів - *A. phagocytophilum*.

Використання препаратів поліклональних імуноглобулінів проти *A. marginale* для виявлення

антигену збудника ГАЛ в РНІФ обґрунтовано високим рівнем (більше 60 %) антигенної спорідненості між *A. marginale* і *A. phagocytophilum* [13, 16].

В Україні та в інших багатьох країнах світу препарати повного корпускулярного антигену *A. marginale* є загальнодоступними і недорогими. Наприклад, комерційне виробництво такого препарату (у формі біобезпечної, інактивованої ліофілізованої бактерійної маси штаму *A. marginale* ВІЭВ1) здійснює Всеросійський НДІ експериментальної ветеринарії ім. Я.Р. Коваленко РАСХН (м. Москва; <http://www.viev.ru>), що, в свою чергу, дозволяє їх широко використовувати в науково-

дослідних установах і на біотехнологічних виробництвах для отримання за спрощеними технологіями діагностичних протианаплазмозних антитіл (сироваток та імуноглобулінів) із більш низькою собівартістю.

З використанням указанного повного корпускулярного антигену штаму *A. marginale* ВІЭВ1 (ПК АнгА1) нами було виготовлено експериментальні зразки діагностичного препарату протианаплазмозних поліклональних імуноглобулінів кролика (протиАнапІgКр). Специфікація експериментальних зразків діагностичного препарату протиАнапІgКр представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Специфікація діагностичного препарату протиАнапІgКр

Зовнішній вигляд	Помірно-каламутна, напівпрозора, однорідна рідина із незначною опалесценцією та сіро-білим відтінком, яка після струшування не містить помітних неозброєним оком включень і осаду.
Загальна характеристика	Колоїдний розчин у фосфатно-сольовому буфері (рН=7,0) γ -глобулінової фракції протианаплазмозних поліклональних сироваток крові кроликів, який містить в якості консерванту 0,05 % азиду натрію. Концентрація білку в препараті протиАнапІgКр становить $(2,213 \pm 0,077)$ мг/мл, робочий титр 1:8.
Метод отримання	ПротиАнапІgКр виготовлено із сироваток крові кроликів, імунізованих повним корпускулярним антигеном штаму <i>A. marginale</i> ВІЭВ1 за технологією, яка включає етапи: виготовлення вакцини, імунізацію лабораторних тварин і отримання протианаплазмозних поліклональних сироваток, виділення γ -глобулінової фракції (шляхом подвійного осадження сульфатом амонію з рН=6,8-7,0) при 50% насиченості суміші та послідовного їх очищення мембранним діалізом), видалення неспецифічних антитіл (методом адсорбції корпускулярним антигеном <i>F. tularensis</i>), стандартизацію рівня активності, хімічну стабілізацію, фасування і маркування препарату.
Основні біологічні властивості	ПротиАнапІgКр характеризуються високим рівнем специфічності, здатні вступати в імунологічні реакції із антигенами (клітинами і мікро колоніями) анаплазм, адсорбуючись на їх поверхні, що забезпечує отримання чіткої люмінесцентно-мікроскопічної картини для оцінки диференційних характеристик при відтворенні РНІФ.

В експерименті на модельних зразках, зразках клінічного та іншого біологічного матеріалу проведено лабораторно-клінічне випробування діагностичного препарату протиАнапІgКр, що дозволило встановити рівні чутливості, специфічності та відтворюваності результатів досліджень з використанням запропонованого способу виявлення антигену збудника анаплазмозу в РНІФ.

Для створення модельних зразків було використано 9 типів гомологічних і гетерологічних (по відношенню до протиАнапІgКр) корпускулярних антигенів філогенетичного найбільш близьких до анаплазм видів бактерій та мікроорганізмів інших таксономічних груп *Proteobacteria*, що є збудниками кліщових бактеріальних інфекцій: α -групи - *Rickettsia prowazekii*, *R. sibirica*, *Brucella abortus*, *Bartonella henselae*, *B. quintan*; β -групи - *Borrelia garinii*; γ -групи - *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*. Модельні зразки являли собою суспензії з визначеною концентрацією корпускулярних анти-

генів, виготовлені шляхом дозованої контамінації комерційними діагностикумами різного виробництва фізіологічного розчину (з рН=7,0) та клінічного матеріалу (кров людей), який за своїм походженням не містив бактерій роду *Anaplasma*. В усіх експериментах із використанням модельних зразків, які містили гетерологічні ПК Анг результати виявлення АнгАІ в РНІФ були негативними. Навпроти, позитивні результати були зафіксовані при тестуванні модельних зразків, контамінованих гомологічним АнгАІ за умови, що концентрація корпускул АнгАІ в модельних суспензіях із фізіологічним розчином становить $(2,6 \pm 1,0) \times 10^4$ /мл, а в модельних суспензіях з кров'ю людей - $(8,5 \pm 3,3) \times 10^5$ /мл.

При випробуванні діагностичного препарату протиАнапІgКр було протестовано 81 зразок клінічного та іншого біологічного матеріалу, походження та результати дослідження яких наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати дослідження зразків клінічного та іншого біологічного матеріалу на наявність АнгАІ в РНІФ при випробуванні діагностичного препарату протиАнапІгКр

Походження досліджених зразків	Кількість досліджених зразків	Позитивний результат виявлення АнгАІ в РНІФ, абс.ч., (%)
Кров і осад центрифугату сироватки осіб укушених кліщем	22	1 (4,5)
Препарати лінії клітин HL-60, інфікованих: зразками крові (осадам центрифугату сироваток) осіб, укушених кліщем та гомогенатами кліщів	27	5 (18,5)
Кров клінічно здорових людей	25	0
Препарати інтактних клітин лінії HL-60	7	0
Всього	81	6 (7,4)

Застосування отриманого препарату протиАнапІгКр суттєво підвищує рівень співпадання результатів досліджень щодо виявлення антигену збудника ГАЛ запропонованим способом РНІФ і методом ПЛР. При тестуванні зразків крові і осаду центрифугату сироваток осіб, укушених кліщем, не було зафіксовано випадків хибно позитивних результатів РНІФ, а коефіцієнт кореляції (r_p) результатів, отриманими з допомогою обох реакцій, становив 1,0. При дослідженні РНІФ і ПЛР препаратів лінії клітин HL-60, інфікованих зразками крові (центрифугатом сироваток) осіб, укушених кліщем, та гомогенатами кліщів r_p результатів склав 0,93. Тобто, лише в одному випадку позитивний результат дослідження, отриманий способом РНІФ, не

співпадав із результатом ПЛР-детекції (останній був негативним). В цілому рівень відтворюваності як позитивних, так і негативних результатів виявлення АнгАІ в РНІФ у модельних, клінічних та зразках іншого біологічного матеріалу при використанні отриманого препарату протиАнапІгКр становив $(94,4 \pm 3,4)\%$. В цілому результати лабораторно-клінічного випробування отриманого препарату протиАнапІгКр для виявлення АнгАІ в РНІФ (таблиця 3) близькі до результатів досліджень зарубіжних авторів [3, 9, 15], які були отримані останніми із використанням інших діагностичних імунобіологічних препаратів (тест-систем) аналогічного призначення.

Таблиця 3

Узагальнені результати випробування отриманого препарату протиАнапІгКр для виявлення АнгАІ в РНІФ при дослідженні модельних, клінічних та зразків іншого біологічного матеріалу

Вивчені показники	Рівень узагальнених показників дослідження модельних, клінічних та зразків іншого біологічного матеріалу для виявлення АнгАІ в РНІФ при використанні отриманого препарату протиАнапІгКр, ($\bar{m} \pm \bar{d}$)
Межа чутливості	в модельній системі: АнгАІ + ФСБ (рН=7,0) $(2,6 \pm 1,0) \times 10^4$ корпускул антигену/мл; в модельній системі: АнгАІ + кров людини $(8,5 \pm 3,3) \times 10^5$ корпускул антигену/мл
Специфічність	$(93 \pm 5)\%$
Відтворюваність	$(93 \pm 5)\%$

Крім того, застосування отриманого препарату протиАнапІгКр з метою виявлення та ідентифікації АнгАІ (клітин і мікроколоній збудника ГАЛ) в РНІФ при дослідженні модельних, клінічних та зразків іншого біологічного матеріалу дозволило отримати чіткі візуальні диференційні характеристики: характер люмінесценції (колір, ступінь яскравості, морфологічні особливості мікроколоній (морул) і клітин збудника АІ, їх присутність і подібність в декількох полях зору (фігура).

Фігура - Люмінесцентно-мікроскопічна картина препаратів мазків клітин HL-60, інфікованих зразками крові осіб, укушених кліщем та гомогенатами

кліщів (з морулоподібними утвореннями - мікроколоніями збудника ГАЛ, вказані стрілкою).

Таким чином, за результатами проведених досліджень розроблено спосіб діагностики анаплазмозу шляхом виявлення антигену збудника в РНІФ, для відтворення якої запропоновано використовувати в якості Ант1 поліклональні протианплазмозні імуноглобуліни кролячі, отримані при імунізації тварин повним корпускулярним антигеном штаму *A. marginale* ВІЭВ1.

Список джерел:

1. Васильєва, И. С. Новые болезни, передаваемые иксодовыми клещами (Ixodidae). Эрлихиозы и анаплазмозы человека [Электронный ресурс] //И.

С. Васильева /Режим доступу: <http://lib.2005.rat-info.ru/files/>.

2. Гратц, Н. Трансмиссивные инфекционные заболевания в Европе. Их распространение и влияние на общественное здравоохранение [Текст] /Норманн Гратц; пер. с англ. //ВОЗ. -2005. - 130с. - С. 87-118.

3. Dumler, J. S. Anaplasma and Ehrlichia infection [Text] /J. S. Dumler //Ann. N. Y. Acad. Sci. -2005. - Vol. 1063. - P. 361-373.

4. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [on line] /D. R. Boone, R. W. Castenholz, D. H. Bergey [et al] /Second edition: "Springer", Volume Two. - 2001. -1338 p. - ISBN 0387241450, 9780387241456 /Режим доступу: <http://books.google.com.ua/books?id=9cwg0-9lyTUC&hl=ru>

5. Demma, L. J. Epidemiology of human ehrlichiosis and anaplasmosis in the United States, 2001-2002 [Text] /L. J. Demma, R. C. Holman, J. H. McQuiston [et al] //Am. J. Med. Hyg. - 2005. - Vol. 73, № 2. - P. 400-406.

6. Tate, C. Experimental infection of white-tailed deer with Anaplasma phagocytophilum, etiologic agent of human granulocytic anaplasmosis [Text] /C. Tate, D. Mead, M. Page Luttrell [et al] // J. Clin. Microbiol. - 2005. - Vol. 43, № 8. -P. 3595-3601.

7. Fuente, J. Infection of tick cells and bovine erythrocytes with one genotype of the intracellular ehrlichia Anaplasma marginale excludes infection with other genotypes [Text] /J. Fuente, J. C. Garcia-Garcia, E. F. Blouin, J. T. Saliki [et al] //Clin. Diagn. Lab. Immunol. -2002. - Vol. 9, № 3. - P. 658-668.

8. Денисов, А. А. Фауна, экология, биология клещей семейства Ixodidae и их роль в эпизоотологии инфекционных болезней в Нижнем Поволжье Российской Федерации [Электронный ресурс]: Дис. ... канд. биол. наук: 03.00.19, 16.00.03: Волгоград, 2005. - 129 с, РГБ ОД, 61: 05 - 3/1265. Режим доступу: <http://www.lib.ua-ru.net/dis/cont/50641.htm/>.

9. Comer, J. A. Serologic testing for human granulocytic ehrlichiosis at a National Referral Center [Text] /J. A. Comer, W. L. Nicholson, J. G. Olson, J.

E. Childs //J. Clin. Microbiol. - 1999. - Vol. 37, № 3. - P. 558-564.

10. Білецька, Г. В. Гранулоцитарний анаплазмоз (ГАЛ) - нова природно-осередкова інфекція в Україні [Текст] /Г. В. Білецька, О. Ю. Новохатній, І. І. Бень //Матеріали науково-практичної конференції "Актуальні питання епідагляду за особливо небезпечними інфекціями, санатрона охорона території, біологічна безпека" - Іллічівськ, 8-10 вересня, 2009. - С. 122-123.

11. Приходько, Ю. А. Клеши (Acarina: Ixodidae) - носители и переносчики возбудителей в Северо-Восточной части Украины [Текст] /Ю. А. Приходько, О. В. Никифорова, В. А. Наглов //Материалы IV Всероссийского съезда паразитологического общества при РАН "Паразитология в XXI веке - проблемы, методы, решения". - Санкт-Петербург, 2008. - Т. 3. - С. 48-53.

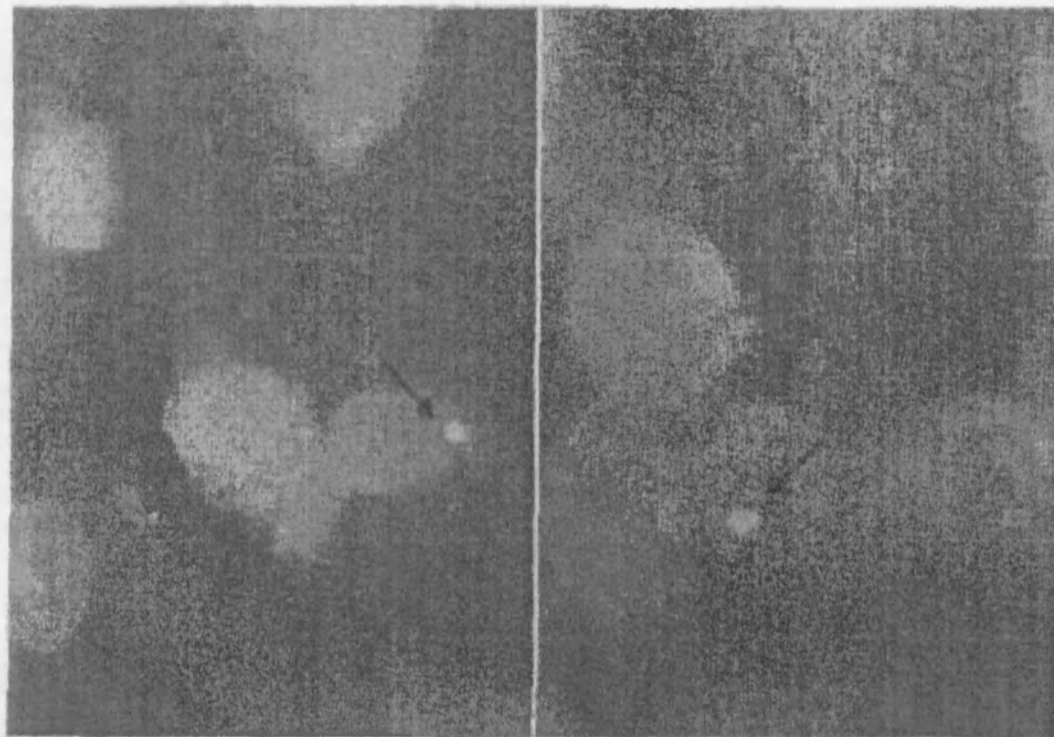
12. Малеев, В. В. Обзор Европейских рекомендаций по диагностике клещевых бактериальных инфекций [Текст] /В. В. Малеев //Клин, микробиол. антимикроб, химиотер. - 2005. - Т. 7, № 2. - С. 130-153.

13. Dreher, U. M. Serologic cross-reactivity between Anaplasma marginale and Anaplasma phagocytophilum /U. M. Dreher, J. Fuente, R. Hofmann-Lehmann [et al] //Clin. Diagn. Lab. Immunol. - 2005. - Vol. 12, № 10. - P.1177-1183.

14. Inokuma, H. Serotyping isolates of Anaplasma phagocytophilum by using monoclonal antibodies [Text] /H. Inokuma, P. Brouqui, J. S. Dumler, D. Raoult // Clin. Diagn. Lab. Immunol. - 2003. - Vol. 10, № 5. - P.969-972.

15. Walls, J. E. Inter- and intralaboratory comparison of Ehrlichia equi and human granulocytic ehrlichiosis (HGE) agents strains for serodiagnosis of HGE by the immunofluorescent-antibody test [Text] /J. E. Walls, M. Aguero-Rosenfeld, J. S. Bakken [et al] //J. Clin. Microbiol. - 1999. - Vol. 37, № 9. - P. 2968-2973.

16. Dumler, J. S. Serologic cross-reactions among Ehrlichia equi, Ehrlichia phagocytophila, and human granulocytic Ehrlichia [Text] /J. S. Dumler, K. M. Asanovich, J. S. Bakken [et al] //J. Clin. Microbiol. - 1995. - Vol. 33, № 5. - P. 1098-1103.



Фіг.